

Glucose dehydrogenase

Patent number: CN1353759
Publication date: 2002-06-12
Inventor: KOJI SODE (JP)
Applicant: KOJI SODE (JP)
Classification:
- international: C12N15/53; C12N15/63; C12N9/04; C12N1/
19; C12Q1/32; C12M1/34
- european:
Application number: CN20000808352 20000501
Priority number(s): JP19990124285 19990430; JP200000009137
20000118

Also published as:

EP1176202 (A1)
WO0066744 (A1)
CA2372741 (A1)

Abstract not available for CN1353759

Abstract of corresponding document: **EP1176202**

Modified water-soluble glucose dehydrogenases having pyrrolo-quinoline quinone as a coenzyme are provided wherein at least one amino acid residue is replaced by another amino acid residue in a specific region. Modified water-soluble PQQGDHs of the present invention have improved affinity for glucose.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-197888

(P 2 0 0 1 - 1 9 7 8 8 8 A)

(43) 公開日 平成13年 7月24日 (2001. 7. 24)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*]	(参考)
C12N 15/09	ZNA	C12M 1/40	B 4B024	
C12M 1/40		C12N 1/15	4B029	
C12N 1/15		1/19	4B050	
1/19		1/21	4B063	
1/21		9/04	D 4B065	
審査請求 未請求 請求項の数15 O L (全12頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願2000-9137 (P 2000-9137)

(22) 出願日 平成12年 1月18日 (2000. 1. 18)

(71) 出願人 596153357

早出 広司

東京都目黒区南1-13-16

(72) 発明者 早出 広司

東京都目黒区南1-13-16

(74) 代理人 100089705

弁理士 社本 一夫 (外5名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 基質特異性に優れたグルコース脱水素酵素

(57) 【要約】

【課題】 グルコースに対する改良された選択性を有する改変型水溶性PQQGDHを提供する。

【解決手段】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするPQQグルコース脱水素酵素において、Acinetobacter calcoaceticus 由来水溶性PQQGDHの第449残基から第468残基に相当する領域において1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されていることを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするPQQグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの462番目のアスパラギン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項2】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするPQQグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの452番目のアスパラギン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項3】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするPQQグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの455番目のリジン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項4】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするPQQグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの456番目のアスパラギン酸残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項5】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするPQQグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの457番目のアスパラギン酸残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項6】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするPQQグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの第449残基から第468残基に相当する領域において1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されていることを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項7】 配列

Thr Ala Gly Xaa1 Val Gln Xaa2 Xaa3 Xaa4 Gly Ser Val Thr Xaa5 Thr Leu GluAsn Pro Gly

(式中、Xaa1、Xaa2、Xaa3、Xaa4、Xaa5は任意の天然アミノ酸残基である、ただし、Xaa1がAsnであり、Xaa2がLysであり、Xaa3がAspであり、かつXaa4がAspであるとき、Xaa5はAsnではない)を含む、PQQグルコース脱水素酵素。

【請求項8】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、βプロペラ蛋白質構造における6番目のWモチーフにおけるBストランドとCストランドをつなぐループ領域(W6BC)中の1またはそれ以上のアミノ酸残基が、他のアミノ酸残基で置換されていることを特徴とする、改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項9】 野生型のPQQGDHと比較してグルコースに対する高い選択性を有する、請求項1-8のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項10】 請求項1-8のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子。

【請求項11】 請求項10に記載の遺伝子を含むベクター。

【請求項12】 請求項10に記載の遺伝子を含む形質転換体。

【請求項13】 請求項10に記載の遺伝子が主染色体に組み込まれている、請求項12記載の形質転換体。

【請求項14】 請求項1-8のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキット。

【請求項15】 請求項1-8のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースセンサー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はピロロキノリンキノン(PQQ)を補酵素とするグルコース脱水素酵素(GDH)の特定のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型PQQGDHに関する。本発明の改変型酵素は、臨床検査や食品分析などにおけるグルコースの定量に有用である。

【0002】

【従来の技術】PQQGDHは、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素であり、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する。

【0003】PQQGDHには、膜結合性酵素と水溶性酵素があることが知られている。膜結合性PQQGDHは、分子量約87kDaのシングルペプチド蛋白質であり、種々のグラム陰性菌において広く見いだされている。例えば、AM. Cleton-Jansen et al., J. Bacteriol. (1990) 172, 6308-6315を参照されたい。一方、水溶性PQQGDHは*Acinetobacter calcoaceticus*のいくつかの株においてその存在が確認されており(Biosci. Biotech. Biochem. (1995), 59(8), 1548-1555)、その構造遺伝子がクローニングされアミノ酸配列が明らかにされている(Mol. Gen. Genet. (1989), 217:430-436)。A. calcoaceticus由来水溶性PQQGDHは、分子量約50kDaのホモダイマーである。他のPQQ酵素とは蛋白質の一次構造上でのホモロジーがほとんどない。

【0004】最近、本酵素のX線結晶構造解析の結果が報告され、活性中心をはじめとした本酵素の高次構造が明らかとなった。(J. Mol. Biol., 289, 319-333(1999), The crystal structure of the apo form of the soluble quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus* reveals a novel internal cons

erved sequence repeat; A. Oubrie et al., The EMBO Journal, 18 (19) 5187-5194 (1999), Structure and mechanism of soluble quinoprotein glucose dehydrogenase, A. Oubrie et al., PNAS, 96 (21), 11787-11791 (1999), Active-site structure of the soluble quinoprotein glucose dehydrogenase complexed with methylhydrazine: A covalent cofactor-inhibitor complex, A. Oubrie et al.). これらの論文によれば、水溶性PQQGDHは6つのW-モチーフから構成されるβプロペラ蛋白質であることが明かとなった。

【0005】血中グルコース濃度は、糖尿病の重要なマーカーとして臨床診断上極めて重要な指標である。また、微生物を用いる発酵生産におけるグルコース濃度の定量がプロセスモニタリングにおいて重要な項目となっている。従来、グルコースはグルコースオキシダーゼ(GOD)あるいはグルコース6リン酸脱水素酵素(G6PDH)を用いる酵素法により定量されていた。しかし、GODを用いる方法ではグルコース酸化反応にともない発生する過酸化水素を定量するため、カタラーゼあるいはパーオキシダーゼをアッセイ系に添加する必要があった。またGODを用いるバイオセンサーの開発も進められてきたが、反応が水溶液中の溶存酸素濃度に依存することから高濃度のグルコース試料には適さないこと、あるいは溶存酸素濃度によって測定値に誤差が生じる可能性があった。一方、G6PDHは分光学的手法に基づくグルコース定量に用いられてきたが、反応系に補酵素であるNAD(P)を添加しなければならないという煩雑性があった。そこで、これまでのグルコース酵素定量方法に用いられてきた酵素にかわる新たな酵素としてPQQGDHの応用が注目されている。PQQGDHはグルコースに対して高い酸化活性を有していること、およびPQQGDHは補酵素結合型の酵素であるため電子受容体として酸素を必要としないことから、グルコースセンサーの認識素子をはじめとして、アッセイ分野への応用が期待されている。しかしながらPQQGDHはグルコースに対する選択性が低いことが問題であった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】したがって本発明はグルコースに対する改良された選択性を有する改変型水溶性PQQGDHを提供することを目的とする。本発明は特に、血中グルコース濃度測定之感度を増加させるために、グルコースに対する反応性と比較してラクトースあるいはマルトースに対する反応性が低い改変型水溶性PQQGDHを提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者は従来の水溶性PQQGDHを改良してそのグルコースに対する選択性を高め、臨床検査や食品分析などに応用できる改変型PQQGDHを開発すべく鋭意研究を行なった結果、水溶性PQQGDHの特定の領域においてアミノ酸変異を導

入することにより、グルコースに対する選択性がきわめて高い酵素を得ることに成功した。

【0008】すなわち、本発明は、ピロロキノリンキノン(PPQ)を補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、天然の水溶性グルコース脱水素酵素の1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ前記天然の水溶性グルコース脱水素酵素と比較してグルコースに対して選択性が向上していることを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素を提供する。好ましくは本発明の改変型グルコース脱水素酵素は、グルコースに対する反応性と比べて、ラクトースあるいはマルトースに対する反応性が野生型より低下している。好ましくは、グルコースに対する反応性を100%とした場合、ラクトースあるいはマルトースに対する活性が60%以下であり、より好ましくは50%以下であり、さらに好ましくは40%以下である。

【0009】本発明はまた、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、βプロペラ蛋白質構造における6番目のW-モチーフにおけるBストランドとCストランドをつなぐループ領域(W6BC)中の1またはそれ以上のアミノ酸残基が、天然に存在するPQQグルコース脱水素酵素中の対応するアミノ酸残基と異なるアミノ酸残基で置換されていることを特徴とする、改変型グルコース脱水素酵素を提供する。

【0010】本発明の1つの態様においては、本発明のPQQグルコース脱水素酵素において、Acinetobacter calcoaceticus 由来水溶性PQQGDHの第449残基から第468残基に相当する領域において1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基、すなわち天然に存在するPQQグルコース脱水素酵素中の対応するアミノ酸残基とは異なるアミノ酸残基で置換されている。なお、本明細書においては、アミノ酸の位置は、開始メチオニンを1として番号付けする。

【0011】好ましくは、本発明の改変型PQQGDHは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の462番目のアスパラギン残基、452番目のアスパラギン残基、455番目のリジン残基、456番目のアスパラギン酸残基および457番目のアスパラギン酸残基に相当するアミノ酸残基の1またはそれ以上が他のアミノ酸残基で置換されている。

【0012】また別の観点においては、本発明の改変型PQQGDHは、配列：

Thr Ala Gly Xaa1 Val Gln Xaa2 Xaa3 Xaa4 Gly Ser Val Thr Xaa5 Thr Leu Glu Asn Pro Gly

(式中、Xaa1、Xaa2、Xaa3、Xaa4、Xaa5は任意の天然アミノ酸残基である、ただし、Xaa1がAsnであり、Xaa2がLysであり、Xaa3がAspであり、かつXaa4がAspであるとき、Xaa5はAsnではない)を含む。

【0013】本発明はまた、上述の改変型グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクター

および該遺伝子を含む形質転換体、ならびに本発明の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキットおよびグルコースセンサーを提供する。

【0014】本発明の改変型PQQGDHの酵素蛋白質はグルコースに対して高い選択性を示し、かつグルコースに対して高い酸化活性を有していることから、グルコースの高感度かつ高選択的な測定に應用できる。

【0015】

【発明の実施の形態】改変型PQQGDHの構造

本発明者は、水溶性PQQGDHをコードする遺伝子のコーディング領域中にエラーブローンPCR法によりランダムに変異を導入し、アミノ酸残基の変異が導入された水溶性PQQGDHのライブラリーを構築した。これを大腸菌に形質転換し、グルコースに対するPQQGDHの活性についてスクリーニングして、これを大腸菌に形質転換し、PQQGDHの活性についてスクリーニングして、20mM濃度のグルコースに対する活性が野生型PQQGDHと同等であるが、20mMのラクトースに対する活性が野生型PQQGDHより低下したPQQGDHを発現する多数のクローンを得た。

【0016】これらのクローンの一つについて遺伝子配列を解析したところ、第452番目のAsnがAspに置換されていることが判明した。さらにこの残基をトレオニン、リジン、イソロイシン、ヒスチジンあるいはアスパラギン酸残基に置換したところ、いずれの残基に置換しても野生型水溶性PQQGDHよりもグルコースに対する選択性が向上した優れた変異酵素が得られた。次に、これらの結果に基づいて、他のアミノ酸残基の変異によるグルコース選択性の向上の可能性について検討した。

【0017】水溶性PQQGDHのX線結晶構造解析に基づく高次構造の報告(J. Mol. Biol., 289, 319-333 (1999), The EMBO Journal, 18 (19) 5187-5194 (1999), PNAS, 96 (21), 11787-11791 (1999))によれば、水溶性PQQGDHは6つのW-モチーフから構成されるβプロペラ蛋白質であり、第452番目のアミノ酸残基は、第6番目のW-モチーフのB-ストランドとC-ストランドを結ぶループ領域に存在する。すなわち、水溶性PQQGDHのW6BCと予測されるループ領域が基質特異性を支配していることが示唆される。そこで、このループ領域中の他のアミノ酸残基に対しても同様に変異を導入した。すなわち、第455番目のリジン残基をイソロイシン残基に、第456番目のアスパラギン酸残基をアスパラギン残基に、第457番目のアスパラギン酸残基をアスパラギン残基に、第462番目のアスパラギン酸残基をヒスチジン残基に置換した変異酵素をそれぞれ構築した。その結果、表3に示すように、いずれの変異酵素においてもグルコースに対する選択性が向上したことがわかった。

【0018】このことはこれらの活性部位を構成する特

定のループ領域に変異を導入することによりグルコースに対する選択性を向上させることを意味する。上記で示したAsn452残基、Lys455、Asp456、Asp457およびAsn462残基は単なる例であり、本発明を限定するものではない。すなわち本発明は水溶性グルコース脱水素酵素の第6番目のW-モチーフ、のBストランドとCストランドを結ぶループ領域(W6BC)中のアミノ酸残基の構造遺伝子の特定の部位に変異を導入することによりグルコースに対する選択性を改良しうることを当該技術分野において初めて明らかにしたものであり、PQQGDHの基質特異性を改良する方法論がここで提供される。

【0019】本発明の好ましいPQQグルコース脱水素酵素においては、Acinetobacter calcoaceticus 由来水溶性PQQGDHの第449残基から第468残基に相当する領域において1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている。好ましくは、本発明の改変型PQQGDHは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の462番目のアスパラギン残基、452番目のアスパラギン残基、455番目のリジン残基、456番目のアスパラギン酸残基および457番目のアスパラギン酸残基に相当するアミノ酸残基の1またはそれ以上が他のアミノ酸残基で置換されている。

【0020】また別の観点においては、本発明の改変型PQQGDHは、配列：

Thr Ala Gly Xaa1 Val Gln Xaa2 Xaa3 Xaa4 Gly Ser Val Thr Xaa5 Thr Leu GluAsn Pro Gly

(式中、Xaa1、Xaa2、Xaa3、Xaa4、Xaa5は任意の天然アミノ酸残基である、ただし、Xaa1がAsnであり、Xaa2がLysであり、Xaa3がAspであり、かつXaa4がAspであるとき、Xaa5はAsnではない)を含む。

【0021】本発明の改変型グルコース脱水素酵素においては、グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有する限り、さらに他のアミノ酸残基の一部が欠失または置換されていてもよく、また他のアミノ酸残基が付加されていてもよい。

【0022】さらに、当業者は、他の細菌に由来する水溶性PQQGDHについても、本発明の教示にしたがってW6BCループ領域内でアミノ酸残基を置換することにより、グルコースに対する選択性が向上した改変型グルコース脱水素酵素を得ることができる。特に、蛋白質の一次構造を並列して比較すること、あるいは当該酵素の一次構造をもとに予測された二次構造を比較することにより、Acinetobacter calcoaceticus 由来の水溶性PQQGDHのW6BCループ領域に相当する領域を容易に認識することができ、本発明にしたがって、かかるループ領域中において1またはそれ以上のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換することにより、基質に対する選択性が改良された改変型グルコース脱水素酵素を得ることができる。これらの改変型グルコース脱水素酵素も本発明の範囲内である。

改変型PQQGDHの製造方法

Acinetobacter calcoaceticus 由来の天然の水溶性PQQGDHをコードする遺伝子の配列は配列番号2で規定される。

【0023】本発明の改変型PQQGDHをコードする遺伝子は、天然の水溶性PQQGDHをコードする遺伝子において、上述のループ領域中に存在するアミノ酸残基をコードする塩基配列を、変異すべきアミノ酸残基をコードする塩基配列に置換することにより構築することができる。このような部位特異的塩基配列置換のための種々の方法が当該技術分野において知られており、例えば、Sambrookら、"Molecular Cloning; A Laboratory Manual", 第2版, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Yorkに記載されている。

【0024】このようにして得た変異遺伝子を遺伝子発現用のベクター（例えばプラスミド）に挿入し、これを適当な宿主（例えば大腸菌）に形質転換する。外来性蛋白質を発現させるための多くのベクター・宿主系が当該技術分野において知られており、宿主としては例えば、細菌、酵母、培養細胞などの種々のものを用いることができる。

【0025】ランダム変異を導入する場合には、標的とするループ領域においてエラープライムPCR法によりランダムに変異を導入し、ループ領域に変異が導入された変異水溶性PQQGDH遺伝子ライブラリーを構築する。

【0026】これを大腸菌に形質転換し、PQQGDHのグルコースに対する選択性について各クローンをスクリーニングする。水溶性PQQGDHは大腸菌において発現させたときにペリプラズム空間に分泌されるため、菌体そのものを用いて容易に酵素活性の検定を行うことができる。このライブラリーを色素としてPMS-DCIPを加え、PQQGDHの活性を目視により判定して、20mM濃度のグルコースに対する活性が野生型PQQGDHと同等であるが、20mMのラクトースに対する活性が野生型PQQGDHより低下したPQQGDHを発現するクローンを選択し、遺伝子配列を解析してその変異を確認する。

【0027】上述のようにして得られた、改変型PQQGDHを発現する形質転換体を培養し、培養液から遠心分離などで菌体を回収した後、菌体をフレンチプレスなどで破碎するか、またはオスモティックショックによりペリプラズム酵素を培地中に放出させる。これを超遠心分離し、PQQGDHを含む水溶性画分を得ることができる。あるいは、適当な宿主ベクター系を用いることにより、発現したPQQGDHを培養液中に分泌させることもできる。得られた水溶性画分を、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、HPLCなどにより精製することにより、本発明の改変型PQQGDHを調製する。

酵素活性の測定方法

本発明のPQQGDHは、PQQを補酵素として、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する作用を有する。

【0028】酵素活性の測定は、PQQGDHによるグルコースの酸化にともなって還元されるPQQの量を酸化還元色素の呈色反応により定量することができる。呈色試薬としては、例えば、PMS（フェナジンメトサルフェート）-DCIP（2, 6-ジクロロフェノールインドフェノール）、フェリシアン化カリウム、フェロセンなどを用いることができる。

選択性の評価方法

本発明のPQQGDHのグルコースに対する選択性は、基質として、2-デオキシ-D-グルコース、マンノース、アロース、3-オ-メチル-D-グルコース、ガラクトース、キシロース、ラクトースおよびマルトース等の各種の糖を用いて上述のように酵素活性を測定し、グルコースを基質としたときの活性に対する相対活性を調べることにより評価することができる。

グルコースアッセイキット

本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを含むグルコースアッセイキットを特徴とする。本発明のグルコースアッセイキットは、本発明に従う改変型PQQGDHを少なくとも1回のアッセイに十分な量で含む。典型的には、キットは、本発明の改変型PQQGDHに加えて、アッセイに必要な緩衝液、メディエーター、キャリアブレーションカーブ作製のためのグルコース標準溶液、ならびに使用の指針を含む。本発明に従う改変型PQQGDHは種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で提供されるが、アポ酵素の形態で提供し、使用時にホロ化することもできる。

グルコースセンサー

本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを用いるグルコースセンサーを特徴とする。電極としては、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明の酵素を固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、あるいはフェロセンあるいはその誘導体に代表される電子メディエーターとともにポリマー中に固定あるいは電極上に吸着固定してもよく、またこれらを組み合わせて用いてもよい。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で電極上に固定化するが、アポ酵素の形態で固定化し、PQQを別の層としてまたは溶液中で提供することもできる。典型的には、グルタルアルデヒドを用いて本発明の改変型PQQGDHをカーボン電極上に固定化した後、アミン基を有する試薬で処理してグルタルアル

デヒドをブロッキングする。

【0029】グルコース濃度の測定は、以下のように行うことができる。恒温セルに緩衝液を入れ、PQQおよびCaCl₂、およびメディエーターを加えて一定温度に維持する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェナジンメトサルフェートなどを用いることができる。作用電極として本発明の改変型PQQGDHを固定化した電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）を用いる。カーボン電極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、グルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のグルコース濃度を計算することができる。

【0030】

【実施例】以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

ない。

実施例1

変異PQQGDH遺伝子ライブラリの構築およびスクリーニング

プラスミドpGB2は、ベクターpTrc99A（ファルマシア社製）のマルチクローニング部位に、Acinetobacter calcoaceticus由来PQQGDHをコードする構造遺伝子を挿入したものである（図1）。このプラスミドをテンプレートとして、エラーブローンPCR法により種々の領域中にランダムに変異を導入した。PCR反応は、表1に示す組成の溶液中で、94℃3分間、次に、94℃3分間、50℃2分間、および72℃2分間を30サイクル、最後に72℃で10分間の条件で行った。

【0031】

【表1】

Taq DNAポリメラーゼ (5 U/μl)	0.5 μl
テンプレートDNA	1.0 μl
フォワードプライマーABF	4.0 μl
リバースプライマーABR	4.0 μl
10× Taqポリメラーゼバッファー	10.0 μl
1M β-メルカプトエタノール	1.0 μl
DMSO	10.0 μl
5mM MnCl ₂	10.0 μl
10mM dGTP	2.0 μl
2mM dATP	2.0 μl
10mM dCTP	2.0 μl
10mM dTTP	2.0 μl
H ₂ O	51.5 μl
	100.0 μl

得られた変異水溶性PQQGDHのライブラリーを大腸菌に形質転換し、形成された各コロニーをマイクロタイタープレートに移した。コロニーを別のプレートにレプリカし、片方のプレートにはグルコース濃度20mMおよびPMS-DCIPを加え、他方のプレートには20mMラクトースおよびPMS-DCIPを加え、双方のPQQGDHの活性を目視で判定した。2枚のプレートでグルコースの示す活性よりもラクトースに対する活性が大幅に低下したクローンが多数得られた。

【0032】このうち1つのクローンを任意に選び、遺伝子配列を解析したところ、452番目のアスパラギンがアスパラギン酸に変異していたことがわかった。

実施例2

改変型酵素PQQGDH遺伝子の構築

配列番号2に示されるAcinetobacter calcoaceticus由来PQQGDHの構造遺伝子をもとに、配列：

5'-C ATC TTT TTG GAC ATG TCC GGC AGT AT-3'

のオリゴヌクレオチドターゲットプライマーを合成し、

452番目のアスパラギンをヒスチジンに置換した。部

位特異的変異はプラスミドpGB2を用いて、図2に示す方法により行った。

【0033】ベクタープラスミドpKF18k（宝酒造（株））にAcinetobacter calcoaceticus 由来PQQGDHをコードする遺伝子の一部を含むKpn I-Hind III断片を組み込み、これをテンプレートとした。このテンプレート50fmolと宝酒造（株）製Mutan（登録商標）-Express Kmキットに付属のセレクションプライマー5pmol、リン酸化したターゲットプライマー50pmolを全体（20μl）の1/10量の同キットのアニーリングバッファーとともに混合し、100℃、3分間の熱処理でプラスミドを変性させ、1本鎖にした。セレクションプライマーはpKF18kのカナマイシン耐性遺伝子上にある二重のアンバー変異を復帰させるためのものである。これを5分間氷上に置き、プライマーをアニーリングさせた。これに3μlの同キットエクステンションバッファー、1μlのT4 DNAリガーゼ、1μlのT4 DNAポリメラーゼおよび5μlの滅菌水を加えて相補鎖を合成した。

【0034】これをDNAのミスマッチ修復能欠損株であるE. coli BMH71-18 mutSに形質転換し、一晚振とう培養を行ってプラスミドを増幅させた。次に、ここから抽出したプラスミドをE. coli MV1184に形質転換し、そのコロニーからプラスミドを抽出した。そしてこれらのプラスミドについてシーケンスを行い、目的とした変異の導入を確認した。この断片を、プラスミドpGB2上の野生型PQQGDHをコードする遺伝子のKpn I-Hind III断片と入れ替え、改変型PQQGDHの遺伝子を構築した。

【0035】同様にして、ループ6BCに相当する領域において、Asp448Asn、Asn452Thr、Asn452Lys、Asn452Ile、Val453Asp、Val453Phe、Asp456Asn、Asp457Asn、Asn462His、Asn462Asp、Asn462Tyr、Asn462Lys、Asn462Pheの各変異を有する改変型PQQGDHの遺伝子を構築した。

実施例3

改変型酵素の調製

野生型または改変型PQQGDHをコードする遺伝子を、E. coli用の発現ベクターであるpTrc99A（ファルマシア社）のマルチクローニングサイトに挿入し、構築されたプラスミドをE. coli DH5 α 株に形質転換した。これを450mlのL培地（アンピシリン50 μ g/ml、クロラムフェニコール30 μ g/ml含有）で坂口フラスコを用いて37℃で一晩振とう培養し、1mM CaCl₂、500 μ M PQQを含む71のL培地に植菌した。培養開始後約3時間でイソプロピルチオガラクトシドを終濃度0.3mMになるように添加し、その後1.5時間培養した。培養液から遠心分離（5000 \times g、10分、4℃）で菌体を回収し、この菌体を0.85% NaCl溶液で2回洗浄した。集菌した菌体をフレンチプレスで破碎し、遠心分離（10000 \times g、15分、4℃）で未破碎の菌体を除去した。上清を超遠心分離（160500 \times g（40000r.p.m.）、90分、4℃）し、水溶性画分を得た。これを粗精製酵素標品として以下の実施例において用いた。

【0036】さらに、こうして得た水溶性画分を10mMリン酸緩衝液pH7.0で一晩透析した。透析したサンプルを10mMリン酸緩衝液pH7.0で平衡化した陽イオン交換クロマトグラフィー用充填カラムTSK g

e1 CM-TOYOPEARL 650M（東ソー株式会社）に吸着させた。このカラムを10mMリン酸緩衝液pH7.0、750mlで洗浄した後、0-0.2M NaClを含む10mMリン酸緩衝液pH7.0を用い、酵素を溶出させた。流速は5ml/minで行った。GDH活性を有する画分を回収し、10mM MOPS-NaOH緩衝液（pH7.0）で一晩透析した。このようにして電気泳動的に均一な改変型PQQGDH蛋白質を得た。これを精製酵素標品として以下の実施例において用いた。

実施例4

酵素活性の測定

酵素活性の測定は、室温において、10mM MOPS-NaOH緩衝液（pH7.0）中においてPMS（フェナジンメトサルフェート）-DCIP（2,6-ジクロロフェノールインドフェノール）を用い、DCIPの600nmの吸光度変化を分光光度計を用いて追跡し、その吸光度の減少速度を酵素の反応速度とした。このとき、1分間に1 μ molのDCIPが還元される酵素活性を1ユニットとした。また、DCIPのpH7.0におけるモル吸光係数は16.3mM⁻¹とした。

実施例5

基質特異性の評価

各改変型酵素の粗精製酵素標品について基質特異性を調べた。実施例3で得られた野生型および各改変型PQQGDHの粗精製酵素標品をそれぞれ1 μ M PQQ、1mM CaCl₂存在下で1時間以上ホロ化した。これを187 μ lずつ分注し、3 μ lの活性試薬（6mM DCIP、600mM PMS、10mMリン酸緩衝液pH7.0を含む）および基質を加えた。基質として、それぞれ終濃度20mMとなるように400mMのグルコース、ラクトースおよびマルトースを10 μ l加え、室温で30分間インキュベートして、実施例4と同様に酵素活性を測定した。値はグルコースを基質としたときの活性を100とし、これれに対する相対活性で表した。表2に示されるように、本発明の改変型酵素はいずれも野生型酵素と比較してグルコースに対する高い選択性を示した。

【0037】

【表2】

	グルコース	ラクトース	マルトース
野生型	100%	61%	61%
Asn452Asp	100%	56%	50%
Asn452His	100%	39%	39%
Asn452Lys	100%	55%	42%
Asn452Thr	100%	42%	30%
Asn452Ile	100%	36%	28%
Lys455Ile	100%	49%	37%
Asp456Asn	100%	59%	41%
Asp457Asn	100%	43%	32%

13
Asn462His 100% 31% 25%

14

実施例 7

グルコースのアッセイ

改変型PQQGDHを用いてグルコースをアッセイした。N452D改変型酵素を、1 μ M PQQ、1 mM CaCl₂存在下で1時間以上ホロ化し、各種濃度のグルコースおよび5 μ M PQQ、10 mM CaCl₂存在下で酵素活性を測定した。方法は実施例4に記載の酵素活性の測定法に準じ、DCIPの600 nmの吸光度の変化を指標とした。図3に示されるように、N452D改変型PQQGDHを用いて、0.1-2.0 mMの範囲でグルコースの定量を行うことができた。

実施例 8

酵素センサーの作製および評価

5ユニットのN452D改変型酵素にカーボンペースト20 mgを加えて凍結乾燥させた。これをよく混合した後、既にカーボンペーストが約40 mg充填されたカーボンペースト電極の表面だけに充填し、濾紙上で研磨した。この電極を1%のグルタルアルデヒドを含む10 mM

M MOPS緩衝液(pH 7.0)中で室温で30分間処理した後、20 mM リジンを含む10 mM MOPS緩衝液(pH 7.0)中で室温で20分間処理してグルタルアルデヒドをブロッキングした。この電極を10 mM MOPS緩衝液(pH 7.0)中で室温で1時間以上平衡化させた。電極は4℃で保存した。

【0038】作製した酵素センサーを用いてグルコース濃度の測定を行った。本発明の改変型PQQGDHを固定化した酵素センサーを用いて、0.1 mM-5 mMの範囲でグルコースの定量を行うことができる。

【0039】

【発明の効果】改変型PQQGDHはグルコースに対する選択性が高いことから、本酵素を用いてアッセイキットあるいは酵素センサーを作成すると、従来の天然型のPQQGDHを用いた場合に比べ、より高い選択性を得ることができる。

【0040】

【配列表】

Sequence Listing

<110> Sode, Koji

<120> Glucose Dehydrogenase

<130> 990387

<160> 4

<210> 1

<211> 454

<212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<400> 1

```

Asp Val Pro Leu Thr Pro Ser Gln Phe Ala Lys Ala Lys Ser Glu Asn
 1             5             10             15
Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu
      20             25             30
Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly
      35             40             45
Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro Glu Ser Gly Ser Val Lys Thr Val Phe
      50             55             60
Gln Val Pro Glu Ile Val Asn Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu
      65             70             75             80
Gly Phe Ala Phe His Pro Asp Phe Lys Asn Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile
              85             90             95
Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn
      100             105             110
Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr Thr Tyr Asn Lys Ser Thr Asp Thr Leu
      115             120             125
Glu Lys Pro Val Asp Leu Leu Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His
      130             135             140
Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr
      145             150             155             160

```

15
 Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn
 165 170 175
 Gln Ala Gln His Thr Pro Thr Gln Gln Glu Leu Asn Gly Lys Asp Tyr
 180 185 190
 His Thr Tyr Met Gly Lys Val Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile
 195 200 205
 Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr
 210 215 220
 Leu Gly His Arg Asn Pro Gln Gly Leu Ala Phe Thr Pro Asn Gly Lys
 225 230 235 240
 Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu
 245 250 255
 Ile Val Lys Gly Gly Asn Tyr Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys
 260 265 270
 Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Ala Asn Lys
 275 280 285
 Ser Ile Lys Asp Leu Ala Gln Asn Gly Val Lys Val Ala Ala Gly Val
 290 295 300
 Pro Val Thr Lys Glu Ser Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro
 305 310 315 320
 Leu Lys Thr Leu Tyr Thr Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro
 325 330 335
 Thr Cys Gly Glu Met Thr Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser
 340 345 350
 Ser Ala Tyr Val Tyr Lys Gly Gly Lys Lys Ala Ile Thr Gly Trp Glu
 355 360 365
 Asn Thr Leu Leu Val Pro Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile
 370 375 380
 Lys Leu Asp Pro Thr Tyr Ser Thr Thr Tyr Asp Asp Ala Val Pro Met
 385 390 395 400
 Phe Lys Ser Asn Asn Arg Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Asp Gly
 405 410 415
 Asn Val Leu Tyr Val Leu Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp
 420 425 430
 Asp Gly Ser Val Thr Asn Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys
 435 440 445
 Phe Thr Tyr Lys Ala Lys
 450

<210> 2

<211> 1612

<212> DNA

<213> *Acinetobacter calcoaceticus*

<400> 2

agctactttt atgcaacaga gcctttcaga aatttagatt ttaatagatt cgttattcat 60
 cataatacaa atcatataga gaactcgtac aaaccttta ttagaggttt aaaaattctc 120
 ggaaaatttt gacaatttat aagggtggaca catgaataaa catttatgg ctaaaattgc 180
 ttatttaagc gcgttcagc tagttacact ctacagcatit gctgatgttc ctctaactcc 240
 atctcaattt gctaaagcga aatcagagaa ctttgacaag aaagtatttc tatctaactt 300
 aataagccg catgctttgt tatggggacc agataatcaa atttggttaa ctgagcgagc 360
 aacaggtaag attctaagag ttaatccaga gtcgggtagt gtaaaacag ttttcaggt 420

17

18

accagagatt gccaatgatg ctagtgggca gaatgggtta ttaggttttg ccttccatcc 480
 tgattttaaa aataatcctt atatctatat ttcaggtaca tttaaaaaac cgaatctac 540
 agataaagaa ttaccgaacc aaacgattat tcgicgttat acctataata aatcaacaga 600
 tacgcicgag aagccagtcg atttattagc aggattacct tcatcaaaag accatcagtc 660
 aggtcgtctt gtcattgggc cagatcaaaa gatttattat acgattggig accaagggcg 720
 taaccagcct gcttatttgi tcttgccaaa tcaagcacia catacgccaa ctcaacaaga 780
 actgaatggt aaagactatc acacctatat gggtaaagta ctacgcttaa atcttgatgg 840
 aagtattcca aaggataatc caagttttaa cgggggtggt agccatattt atacacttgg 900
 acatcgtaat ccgcagggci tagcattcac tccaaatggt aaattattgc agtcigaaca 960
 aggcccaaac tctgacgatg aaattaacct catigtcaaa ggtggcaatt atggttggcc 1020
 gaatgtagca ggttataaag atgatatggc ctatgcttat gcaaatattt cagcagcagc 1080
 caataagtca attaaggatt tagctcaaaa tggagtataa gtagccgcag ggtccctgt 1140
 gacgaagaa tctgaatgga ctggtaaaaa ctttgtccca ccattaaaaa ctttatatac 1200
 cgttcaagat acctacaact ataacgatcc aacttgtgga gagatgacct acatttgctg 1260
 gccaacagtt gcaccgtcat ctgcctatgt ctataagggc ggtaaaaaag caattactgg 1320
 ttgggaaaat acattattgg ttccatcttt aaaacgtggt gtcattttcc gtattaagtt 1380
 agatccaact tatagcacta cttatgatga cgcigtaccg atgtttaaga gcaacaaccg 1440
 ttatcgtgat gtgattgcaa gtccagatgg gaatgtctta tatgtattaa ctgatactgc 1500
 cggaatgtc caaaaagatg atggctcagt aacaaatata ttagaaaacc caggatctct 1560
 cattaagttc acctataagg ctaagtaata cagtcgcaat aaaaaaccga tc 1612

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<220>

<222> 4

<223> Xaa is any amino acid residue

<222> 7

<223> Xaa is any amino acid residue

<222> 8

<223> Xaa is any amino acid residue

<222> 9

<223> Xaa is any amino acid residue

<222> 14

<223> Xaa is any amino acid residue

<400> 3

Thr Ala Gly Xaa Val Gln Xaa Xaa Xaa Gly Ser Val Thr Xaa Thr Leu

1

5

10

15

Glu Asn Pro Gly

20

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 4

catctttttg gacatgtccg gcagtat 17

【図面の簡単な説明】

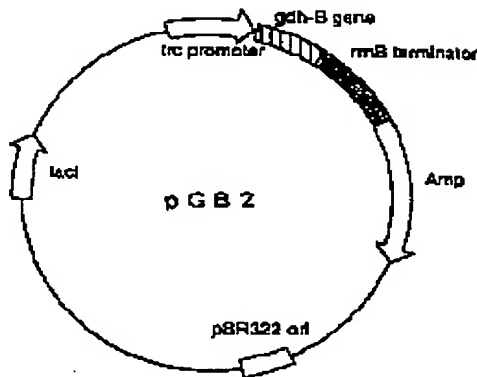
GB 2 の構造を示す。

【図 1】 図 1 は、本発明において用いたプラスミド p 50 【図 2】 図 2 は、本発明の改変型酵素をコードする突

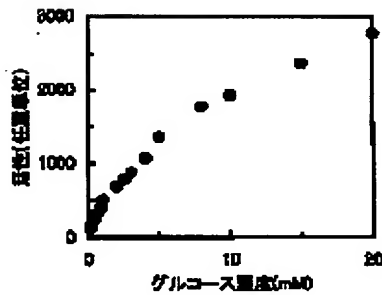
然変異遺伝子を作成する方法を示す。

【図3】 図3は、本発明の改変型PQQGDHを用い

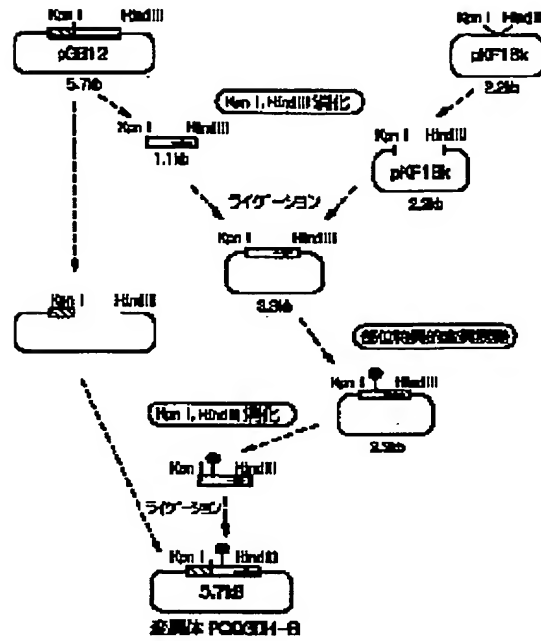
【図1】



【図3】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷

識別記号

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 5/10
9/04
C 1 2 Q 1/32
G 0 1 N 27/327
// (C 1 2 N 15/09
C 1 2 R 1:01)
(C 1 2 N 9/04
C 1 2 R 1:19)

Z N A

C 1 2 Q 1/32
C 1 2 R 1:01
(C 1 2 N 9/04
C 1 2 R 1:19)
C 1 2 N 15/00
5/00
G 0 1 N 27/30
C 1 2 R 1:01)

D
Z N A A
A
3 5 3 J

BEST AVAILABLE COPY

F ターム (参考) 4B024 AA11 BA08 CA04 DA06 EA04
GA11 HA11
4B029 AA08 BB02 CC03 FA12
4B050 CC03 DD02 FF05E FF11E
LL02 LL03
4B063 QA01 QA18 QQ68 QR04 QR50
QR82 QX05
4B065 AA04Y AA26X AA62X AA80X
AA90X AA91X AB01 AC14
BA02 CA28 CA46